

Bioluminiscence

Bioluminiscence je emise světla z biochemických reakcí, které se objevují v živých organismech.

Nejznámější příklad - světluška.

Bioluminiscence však je fylogeneticky rozšířený fenomén, který se rozvíjel nezávisle u mnoha živočichů a mikrobů.

Bioluminiscence existuje u mnoha organismů:

Bakterie

Houby

Prvoci (Dinoflagelata - obrněnky)

Láčkovci (medúza, korál)

(Červi)

Měkkýši

Členovci

Ryby

Obvyklá hlavně v hlubinách moří, kde obecně všichni živočichové emitují světlo v celém spektru barev

Charakteristické rysy všech bioluminiscenčních reakcí

1. Probíhají pouze v přítomnosti kyslíku

2. Vždy jsou zapotřebí dva typy látek:

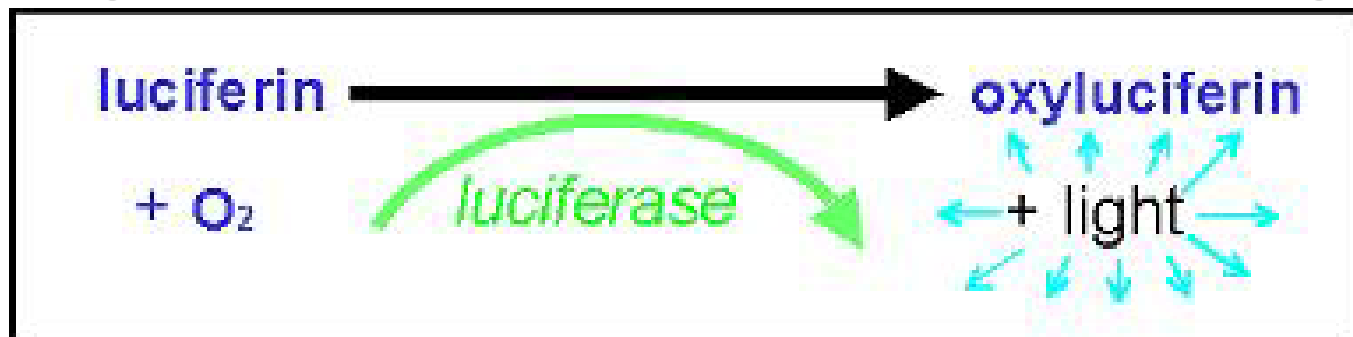
luciferin

luciferáza

(lucifer znamená přinášející světlo).

Struktura a vlastnosti luciferázy a luciferinů se liší u jednotlivých skupin lumineskujících organismů

3. Luciferin je základním substrátem reakce a produkuje světlo



4. Luciferáza katalyzuje reakci.

Luciferim + luciferáza \longrightarrow oxyluciferim (inaktivní) + světlo

Luciferin je buď:

v organismech syntetizován
nebo je dodáván v potravě

5. Někdy jsou luciferin a luciferáza navázány a tvoří jednotku nazvanou **fotoprotein**.

Aktivita fotoproteinu je spuštěna, když určitý iont je dodán do systému

Tímto iontem je většinou vápník

Funkce (účel) BL:

Přilákat druhého jedince stejného druhu (sexy svit)

Přilákat kořist

Odpudit predátora, reakce na šok (aequorea)

Kamufláž

Houby lákají hmyz – pomáhají šířit spory.

Někdy svítí mycelium – účel ???

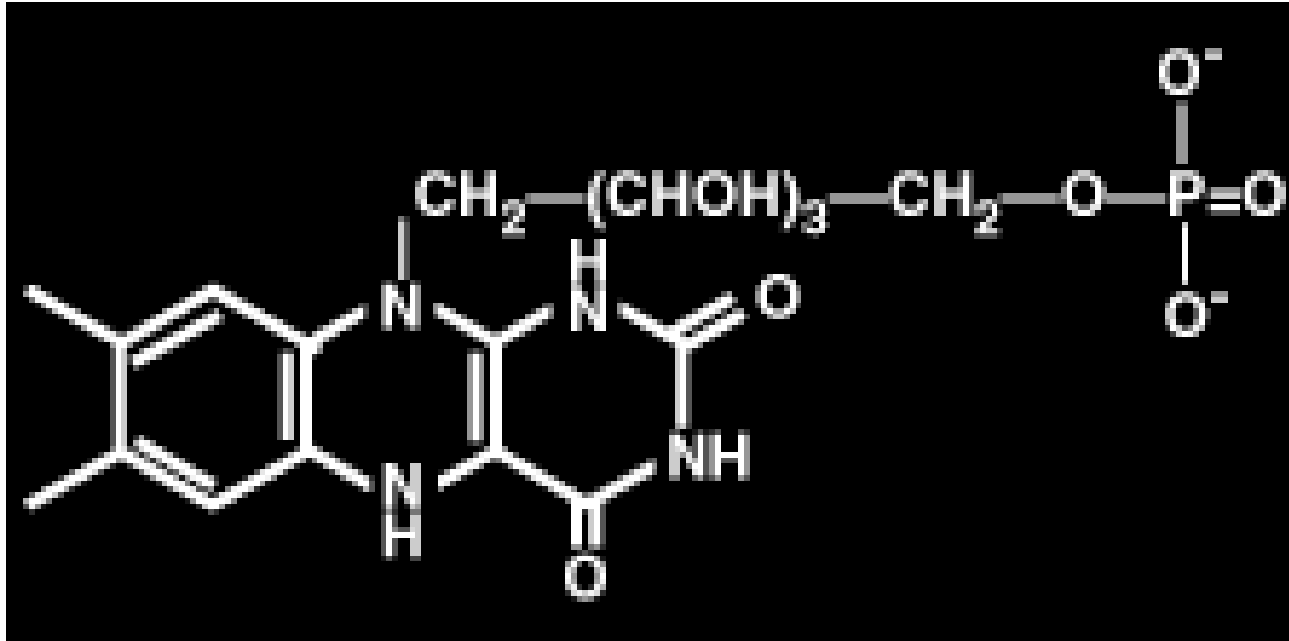
Bioluminiscence bakterií

Je světlo produkováno bakteriemi jako
výsledek chemických reakcí

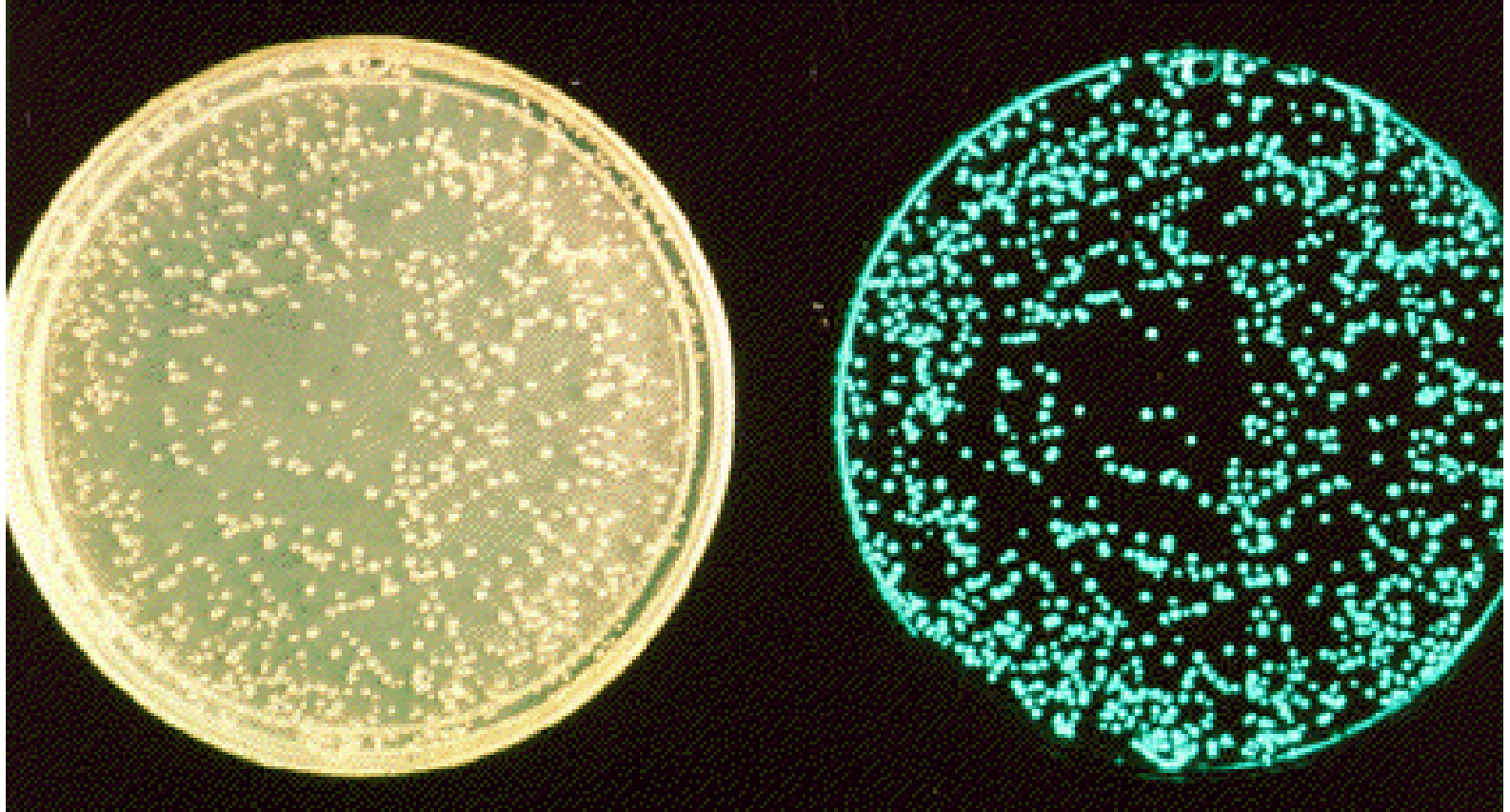
**Bakteriálním luciferinem je redukováný riboflavin fosfát,
který je oxidován v přítomnosti aldehydu s dlouhým
řetězcem, kyslíku a luciferázy.**

Bakteriální bioluminiscence se objevuje hlavně u
mořských, ale i u některých terestrických bakterií

FMNH₂ = redukovaný riboflavin fosfát
= **luciferin**



RCHO = aldehyd s dlouhým řetězcem (tetradecanal)



Vibrio fischeri iluminuje světelný orgán chobotnice



Když je živočich vyrušen, emituje luminiscenční oblak. Je to obdoba inkoustu u příbuzných z mělčích vod.

Bioluminescence hub

Panellus stipticus

Po vysušení *houba přestává svítit, po zvlhčení svítí opět.*



Bioluminiscence prvoků

Typický příklad:

Rostlinní bičíkovci (řasy ??)

Dinoflagellata (= obrněnky)

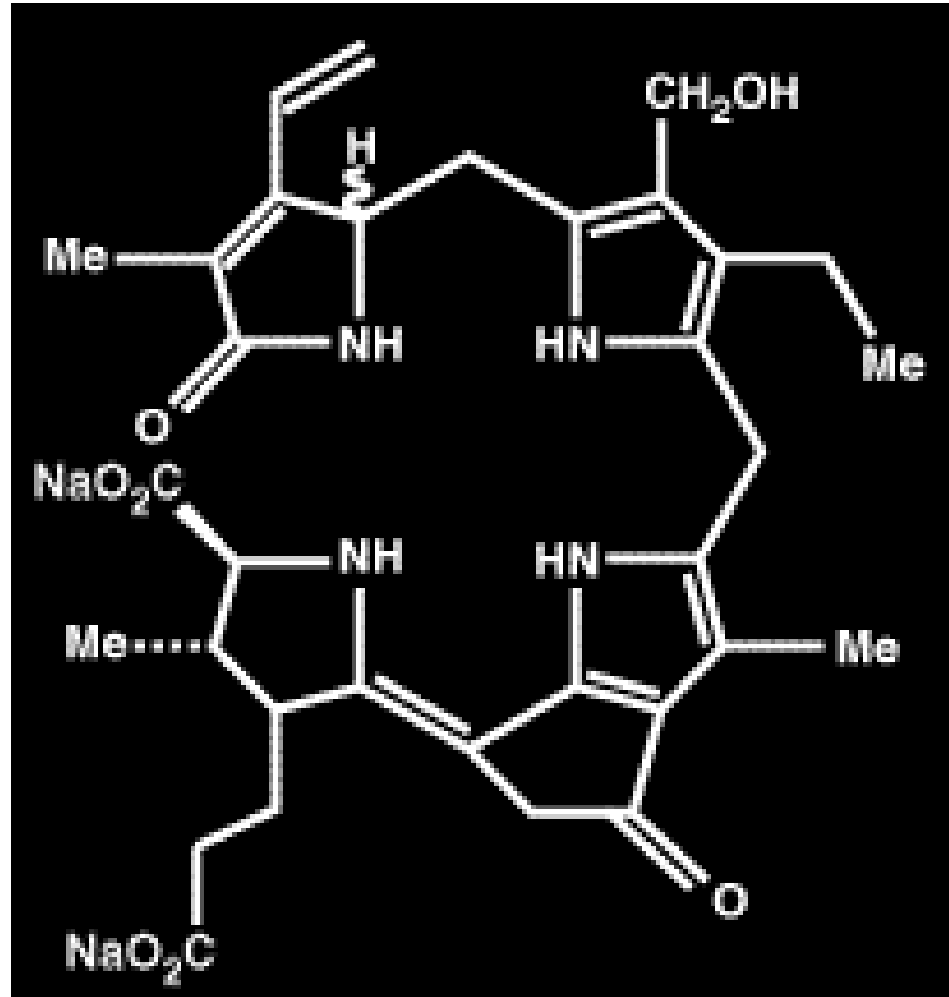
Planktonní bičíkovci hojní v teplých mořích.

Luciferin je zde pravděpodobně odvozen od chlorofylu, který má podobnou strukturu.

Noctiluca miliaris, N. scintilans, Pyrocystis fusiformis

U rodu *Gonyaulax*, při pH 8 je molekula luciferinu „chráněna“ před luciferázou pomocí "luciferin-binding protein", když pH klesne, volný luciferin může reagovat a světlo je produkováno.

Luciferin obrněnek



Pyrocystis fusiformis.

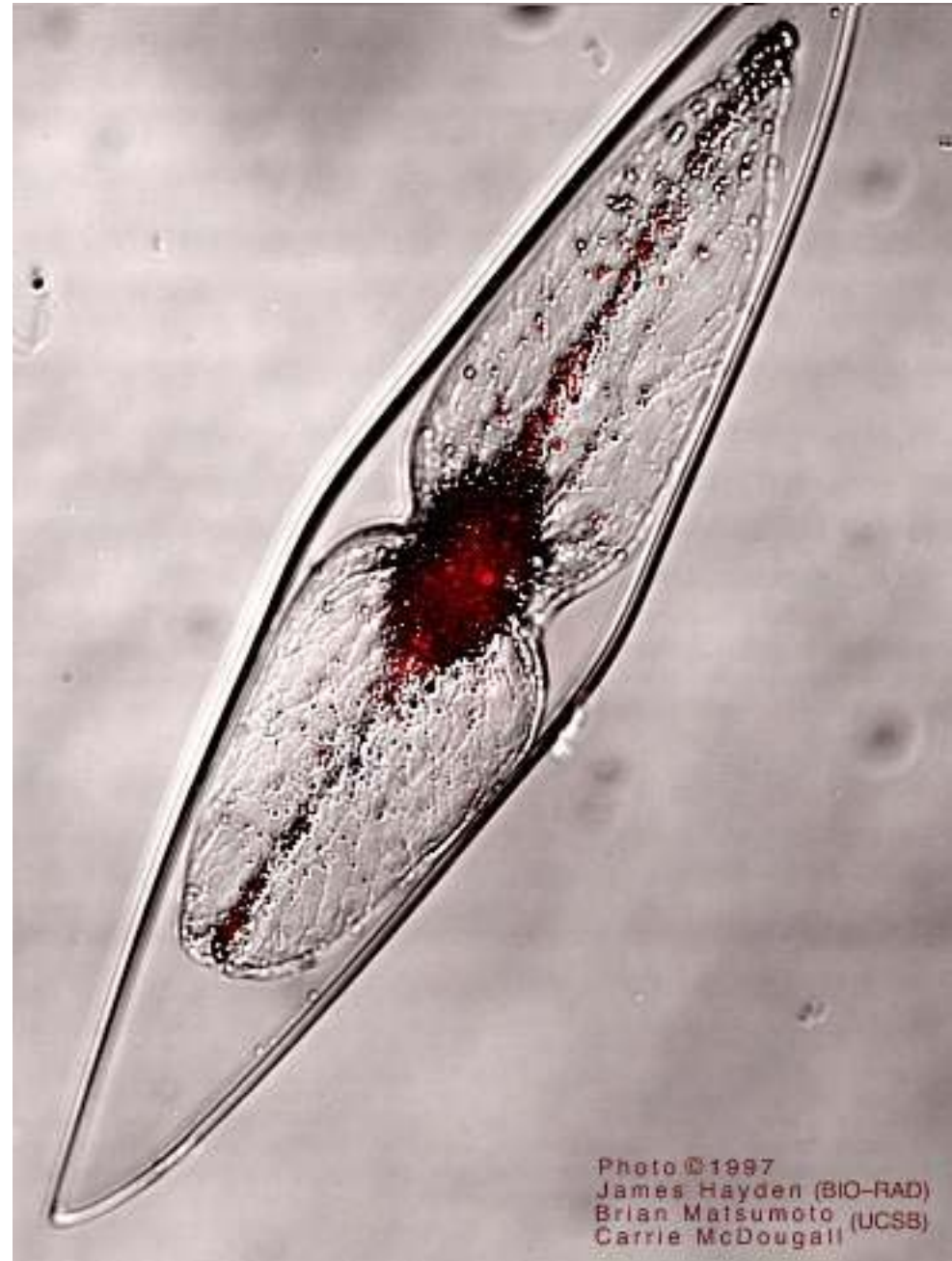
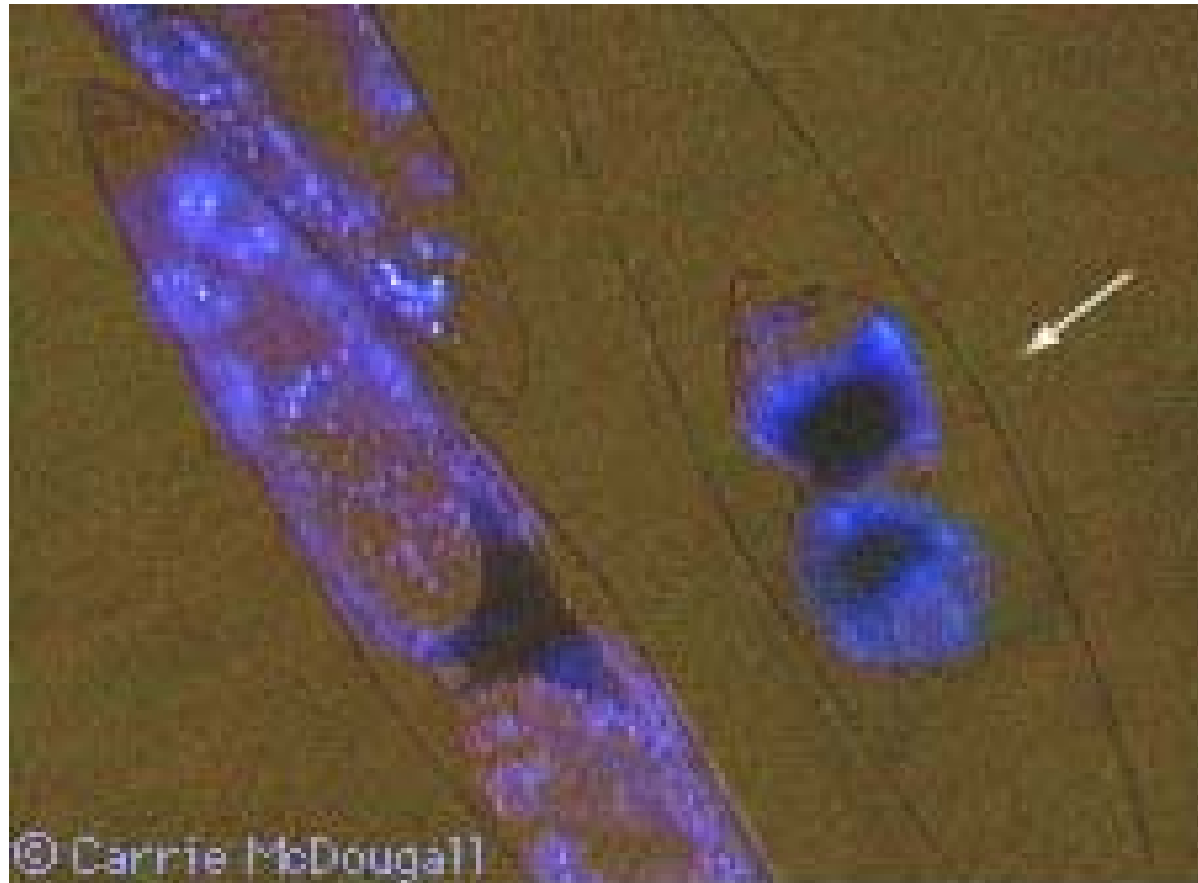


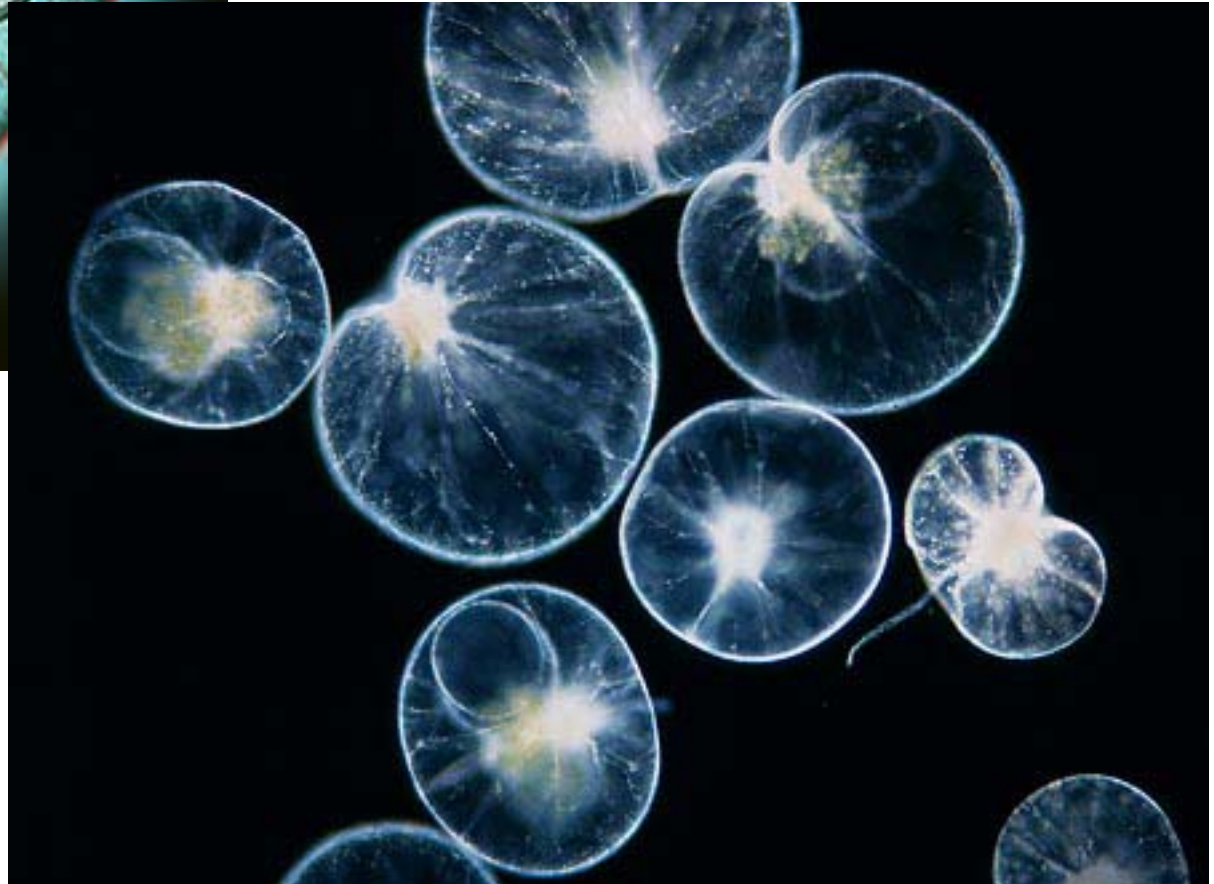
Photo © 1997
James Hayden (BIO-RAD)
Brian Matsumoto (UCSB)
Carrie McDougall

Bioluminescence obrněnek



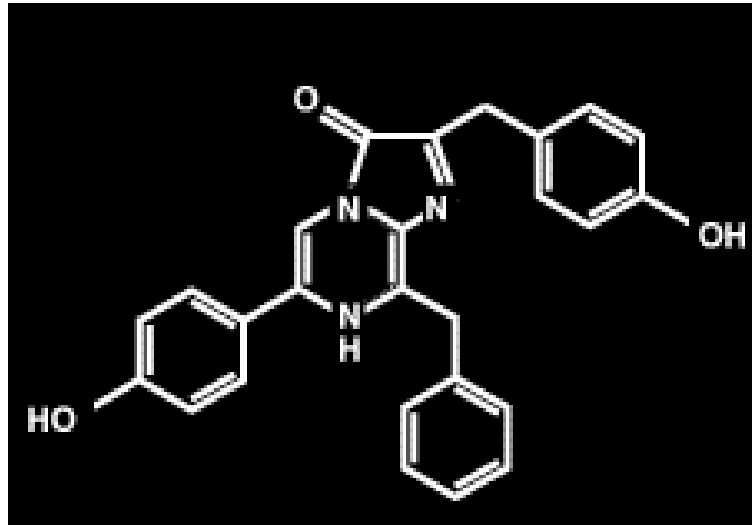
© Carrie McDougall
Actual color of bioluminescence from 3
Pyrocystis fusiformis cells. One (arrow) has just
reproduced and both new "baby" cells still occupy
the same cell wall.

Noctiluca scintillans



Bioluminiscence láčkovců

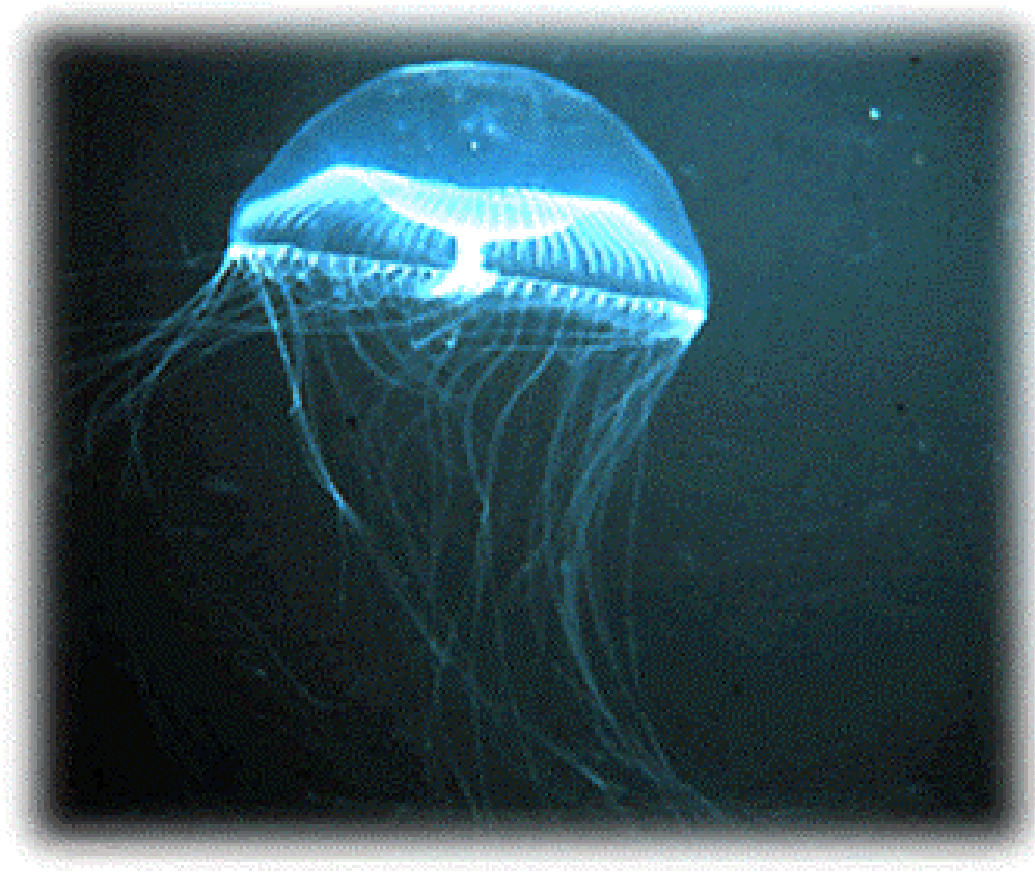
Typickým luciferinem pro láčkovce je **Coelenterazin**



Je to obecně nejrozšířenější mořský luciferin nalezený v mnoha živočišných taxonech

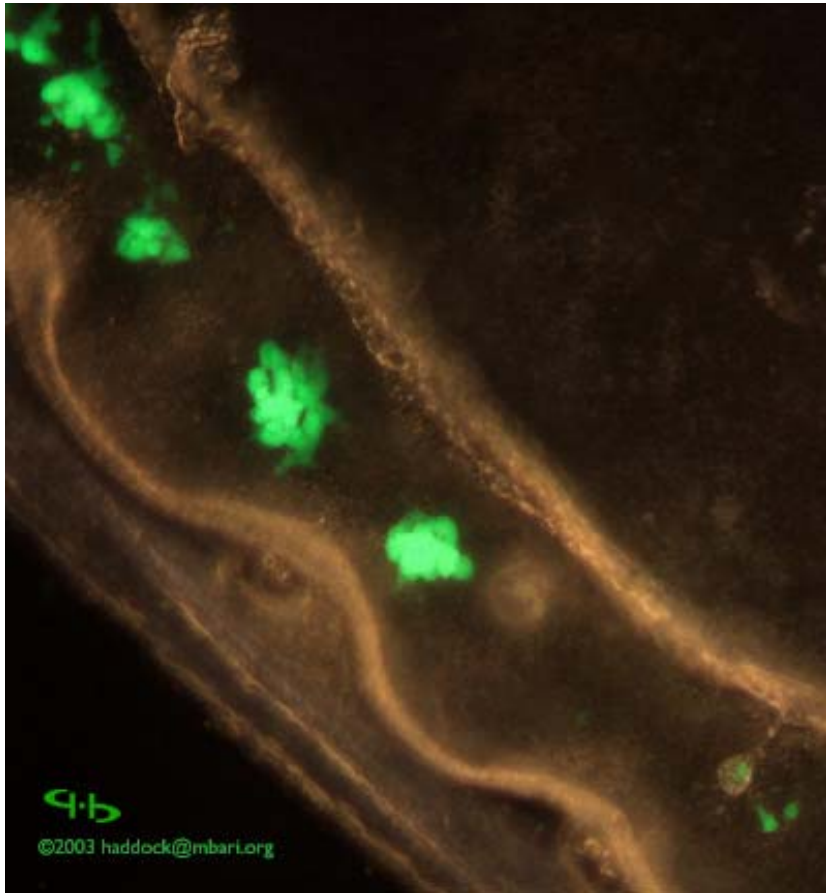
Molekula luciferinu se může objevit v komplexu **luciferin-luciferáza** – fotoprotein nazvaný **aequorin**

Modré světlo vyvolané fotoproteinem aequorinem z medúzy
Aequorea victoria

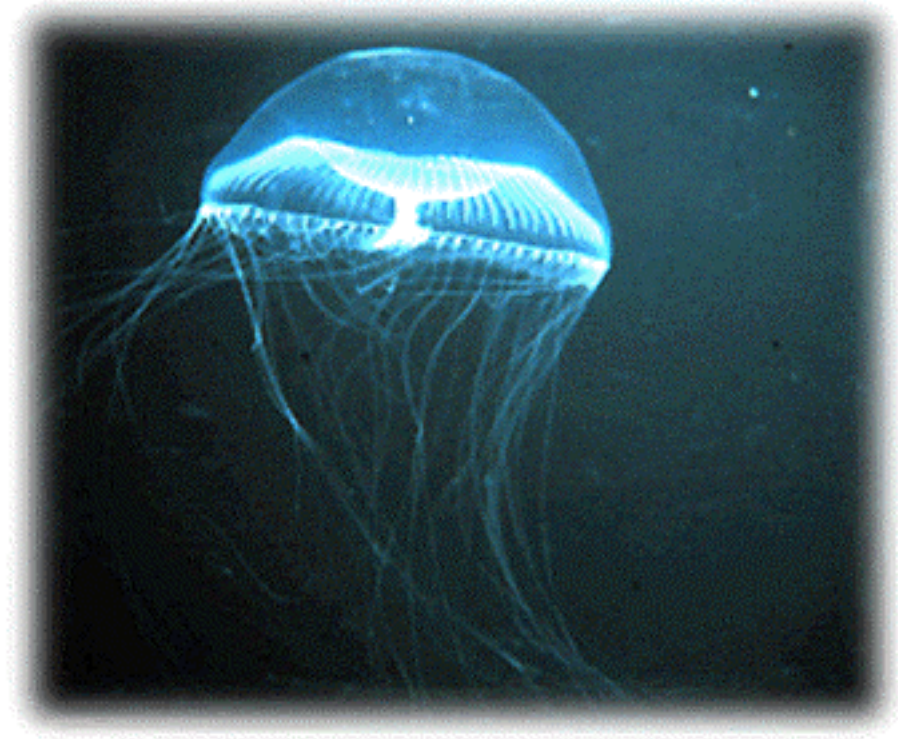


Někdy žahavci emitují světlo nikoliv přes aequorin, ale přes GFP – potom je světlo zelené

Aequorea victoria - okraj zvonu



Někdy žahavci emitují světlo nikoliv přes aequorin, ale přes GFP – potom je světlo zelené



Bioluminescence in Aequoria victoria



aequorin



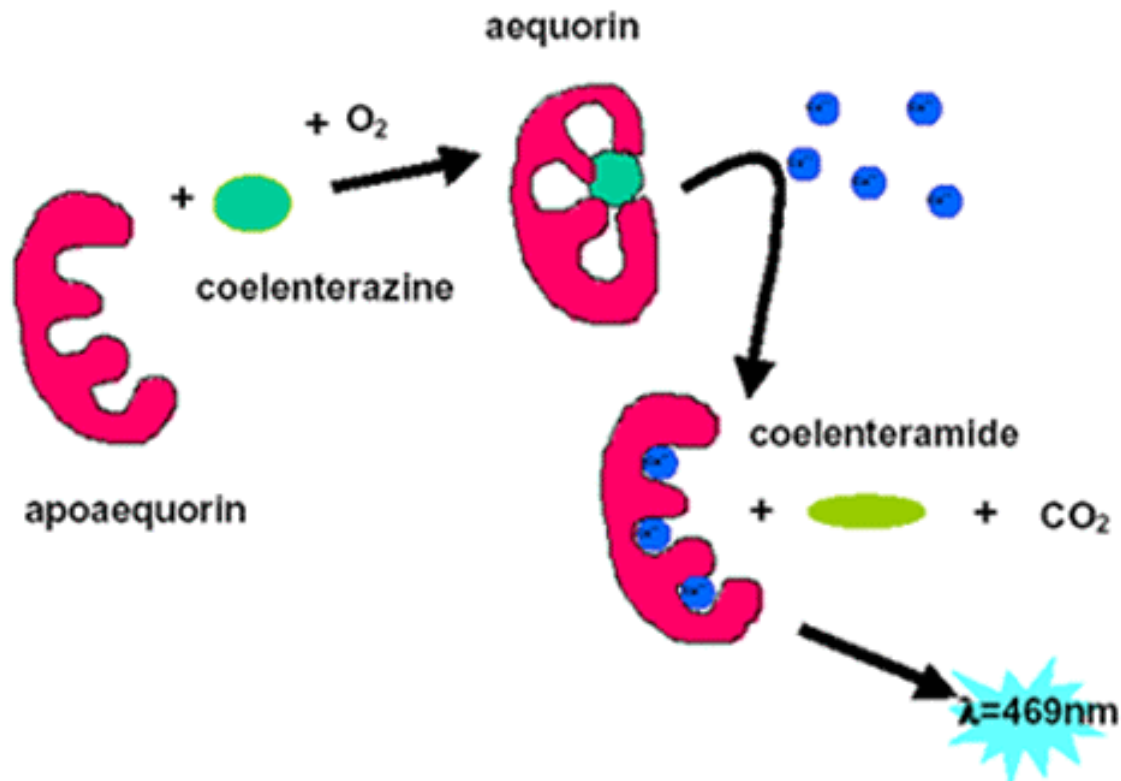
green fluorescent protein

Aequorin – využití pro analýzu Ca^{2+}

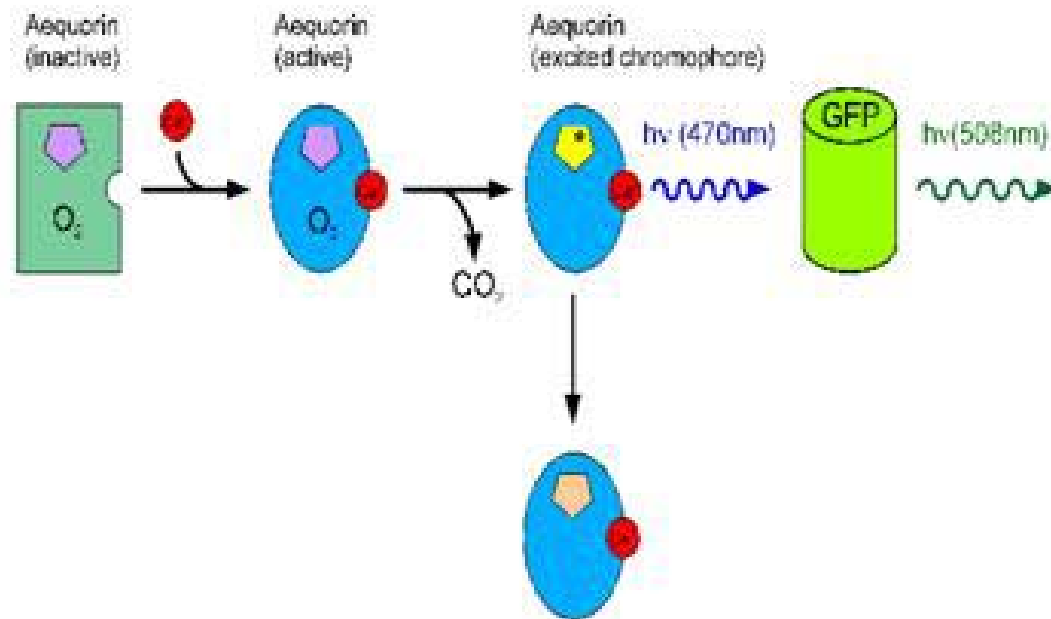
Je fotoproteinový komplex izolovaný z medúzy *Aequorea* (a jiných mořských druhů).

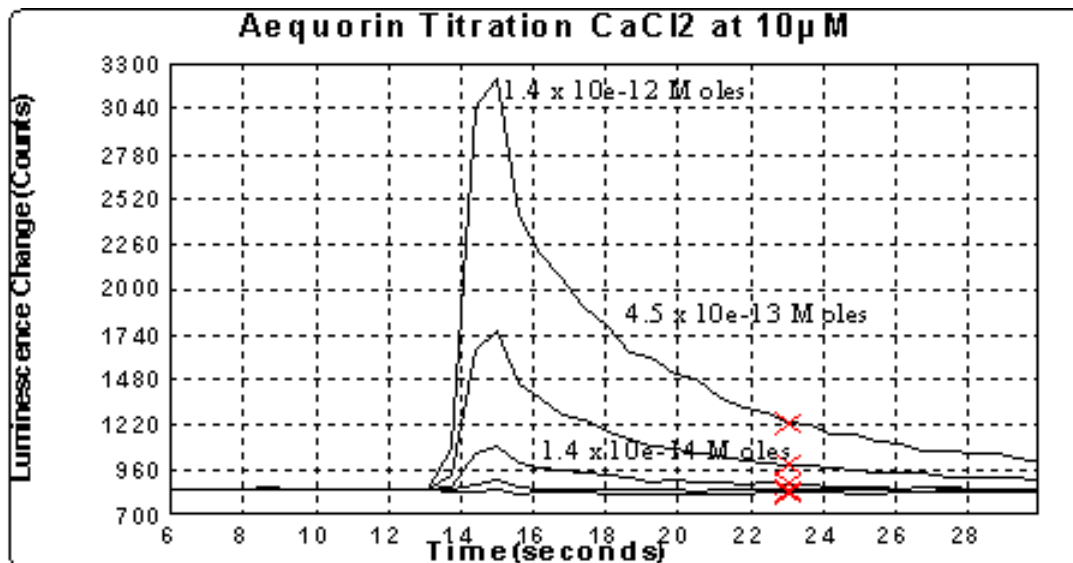
Funkční komplex = 22,000 MW apo-aequorin (protein), molekulární kyslík a luminofor coelenterazin.

Když se Ca^{2+} naváže na komplex, coelenterazin je oxidován na coelenteramide při uvolnění CO_2 a modrého světla (469 nm).

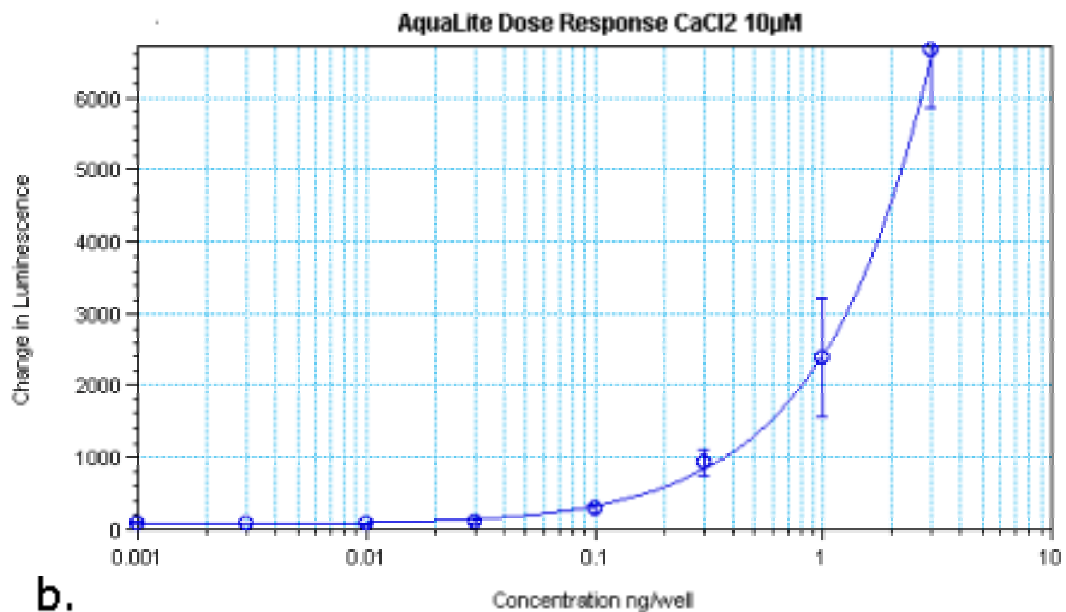


GFP – mechanismus emise světla





a.



b.

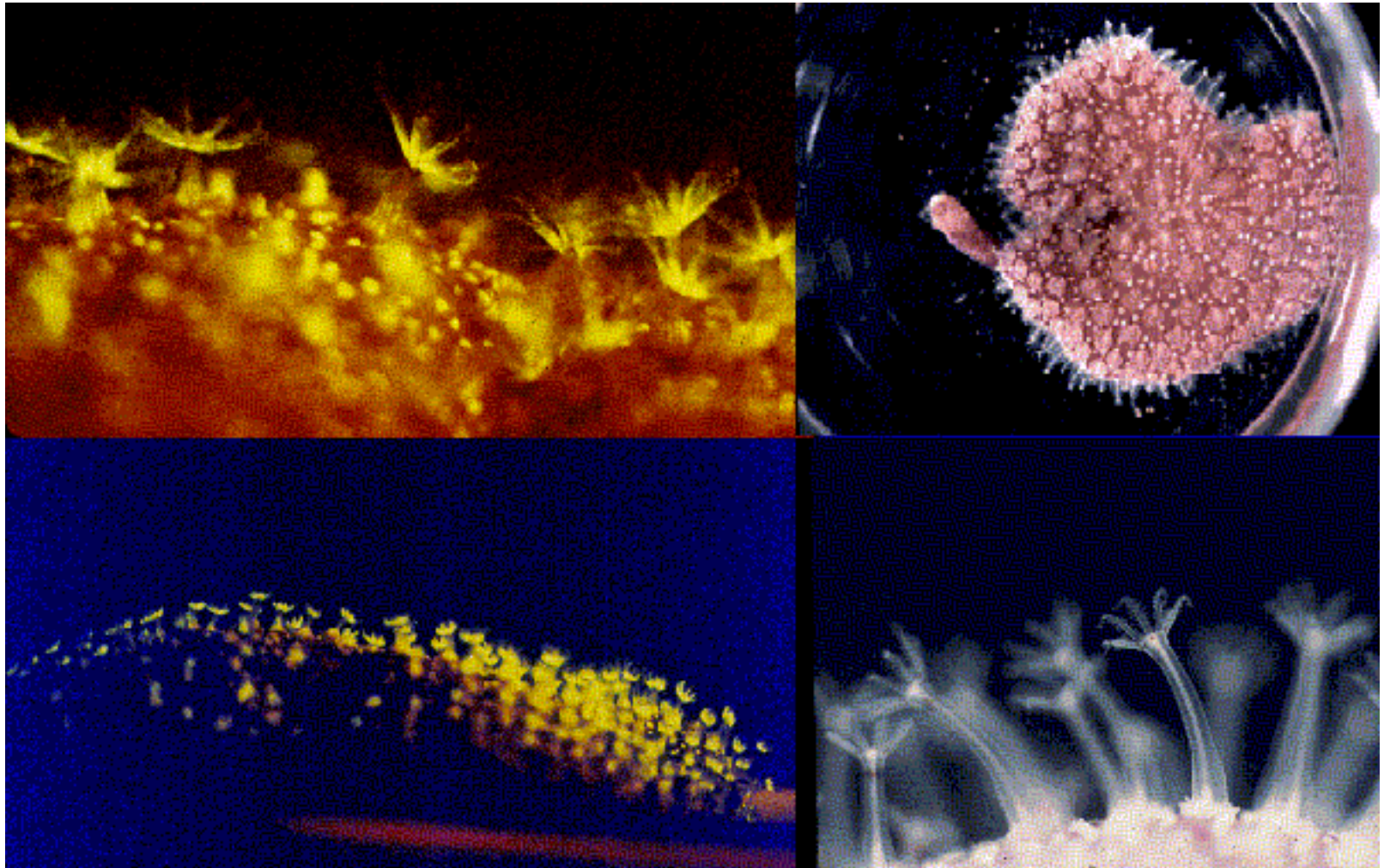
Pro doplnění:

Lumineskující hydroid *Obelia* (malá medúza)

Reaguje podobně jako aequorin na přítomnost iontů vápníku

Obelin = evropský příbuzný amerického aequorinu

Bioluminescence korálů



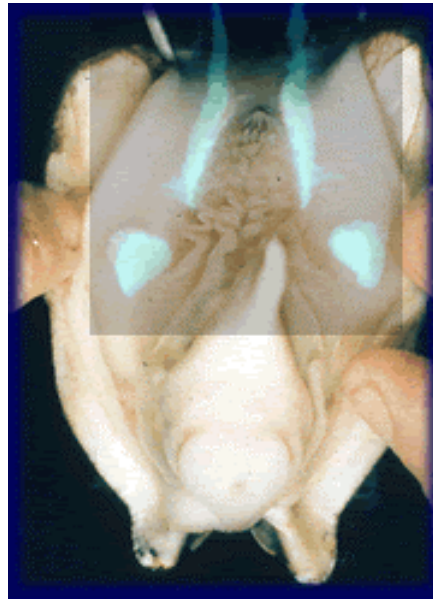
Renilla reniformis, the Sea Pansy, is a soft coral. The organism is a colony of polyps each of which is bioluminescent at the sites identified by the characteristic green fluorescence (photos by James M. Anderson).

© 1997 J. E. Wampler

Bioluminescence měkkýšů

PHOLASIN

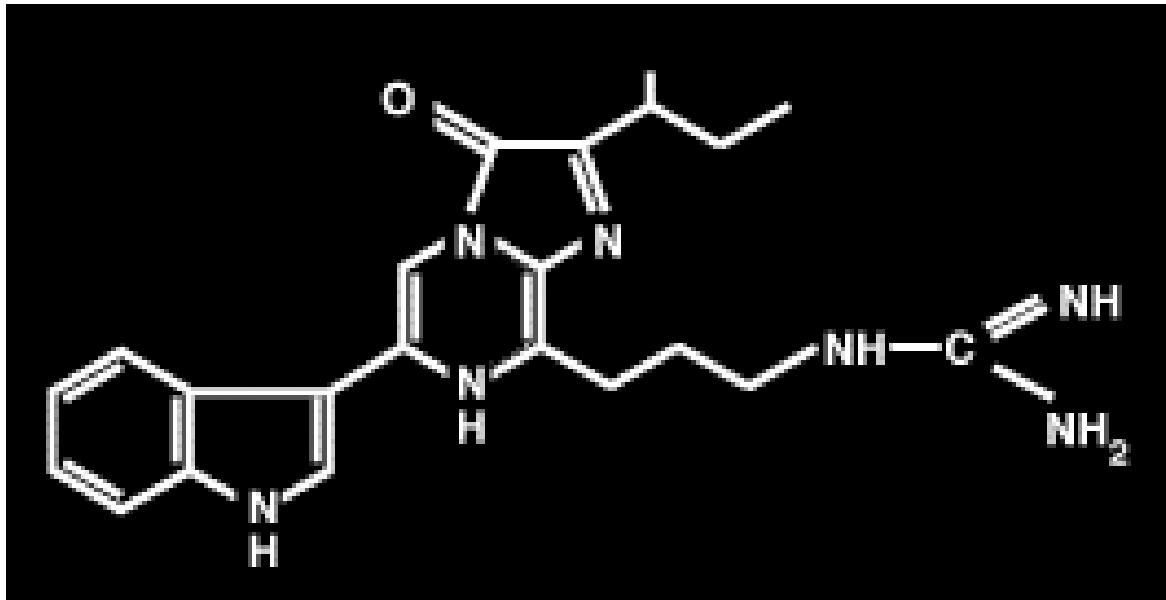
Photoprotein of the bioluminescent mollusc (*Pholas dactylus*)



- Pholasin is isolated and purified by:
- Knight Scientific Limited (UK)

Bioluminiscence korýšů

Vargulin je luciferin nalezený u garnáta *Vargula*. Tento korýš *Vargula* má dvě luminiscenční žlázy schopné rychle vystříknout luciferin a luciferázu do mořské vody. Tato luminiscence má za účel vylekat jejich predátory.



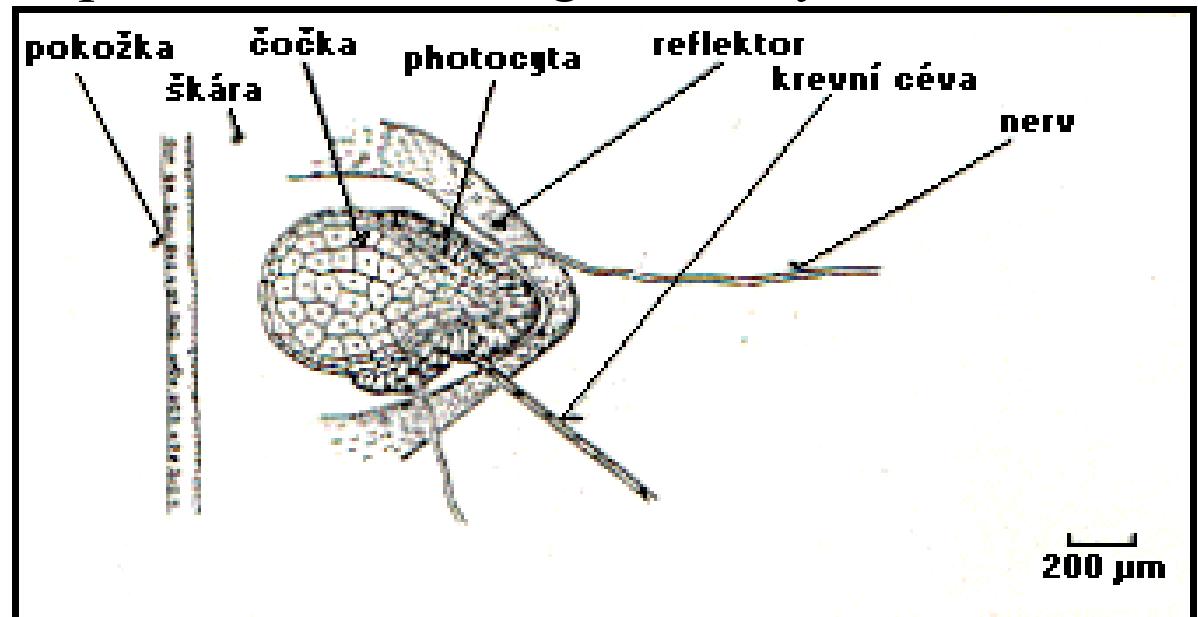
Bioluminiscence korýšů

Vargulin je rovněž používán rybou *Porichthys*.

Zde je přímá souvislost s potravou – ryba emituje BL pouze tehdy, přijímá-li potravu nesoucí vargulin.

Luciferin a luciferáza vznikají ve zvláštních buňkách nazývaných photocyty.

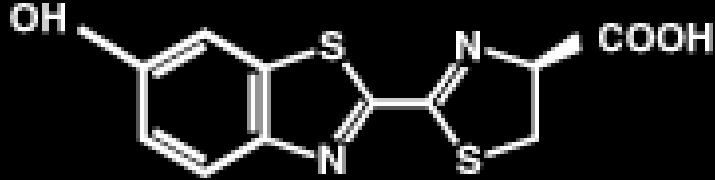
Tyto buňky jsou buď různě rozmístěny ve tkáních organismu, nebo seskupené v jednom specializovaném orgánu, nazývaném photophory.



Porichthys.



Bioluminescence světlušek



Luciferin světlušek je použit v luciferin-luciferázovém systému, který vyžaduje ATP jako kofaktor. Toho je využíváno v mnoha analytických testech.

Celých 96 % oxidační energie se přemění přímo na světlo.

By comparison, a normal electric light bulb gives off only 10% of its energy as light, while 90% is wasted as heat.



Jak světlušky získávají energii?

Jsou masožraví. Živí se hlavně plži. Sliny larev obsahují anestetikum, které jim umožňuje poměrně klidné hodování.

Svítit dokáží nejen létající samečci a na zemi žijící samičky, ale i larvy. Mnohdy svítí i vajíčka.

Světélkování dospělců („sexy-svit“) umožňuje sblížení jedinců, kteří si způsobem svícení vzájemně imponují.

Světlo také napomáhá vymezovat teritorium a upozorňuje i na nebezpečné překážky (pavučina, voda).

Regulace emise světla světluškami:

Vzplanutí nervové aktivity stimuluje uvolnění primárního neurotransmiteru - **octapaminu**.

To spouští světelný orgán lokalizovaný na zadečku, který obsahuje tisíce fotocytů s organelami obsahujícími luciferin a luciferázu. Ty reagují a emitují světlo, pokud je přítomen kyslík. Ten je dodáván z mitochondrií přítomných na koncích fotocytů.

Které faktory kontrolují emisi světla ???

Kyslík proudí do mitochondrií fotocytů. Nějaká látka musí regulovat oxidaci luciferinu a luciferázy v peroxisomech fotocytů, pokud světluška chce/nechce svítit..

([Aprille et al, 2004](#)) - mitochondriální spotřeba kyslíku je konečný kontrolní bod pro odstranění veškerého kyslíku, který dosáhne fotocytů.

V odpovědi na neuronální excitaci je uvolňován NO – ten inhibuje extrakci kyslíku mitochondriemi.

To dovoluje kyslíku oxidovat luciferin.

Jak mechanismus funguje ??

Světlo není

Kyslík je dodáván „lanternovým tracheolárním systémem a je konzumován mitochondriemi fotocytů

To způsobuje hypoxii cytoplasmy fotocytů a brání kyslíku, aby dosáhl peroxisomů (organel obsahujících luciferin a luciferázu).

ATP produkované oxidativní fosforylací je zapotřebí k formování a akumulaci aktivovaného luciferyl-adenylát meziproduktu (označený jako Luciferin*).

Světlo je

Neurotransmitter octopamin aktivuje „lantern“ NO syntázu (NOS), která produkuje NO. NO difunduje rychle a inhibuje zpracování kyslíku mitochondriemi fotocytů.

Kyslík dodávaná tracheolami difunduje do peroxisomů a spouští reakci produkující světlo.

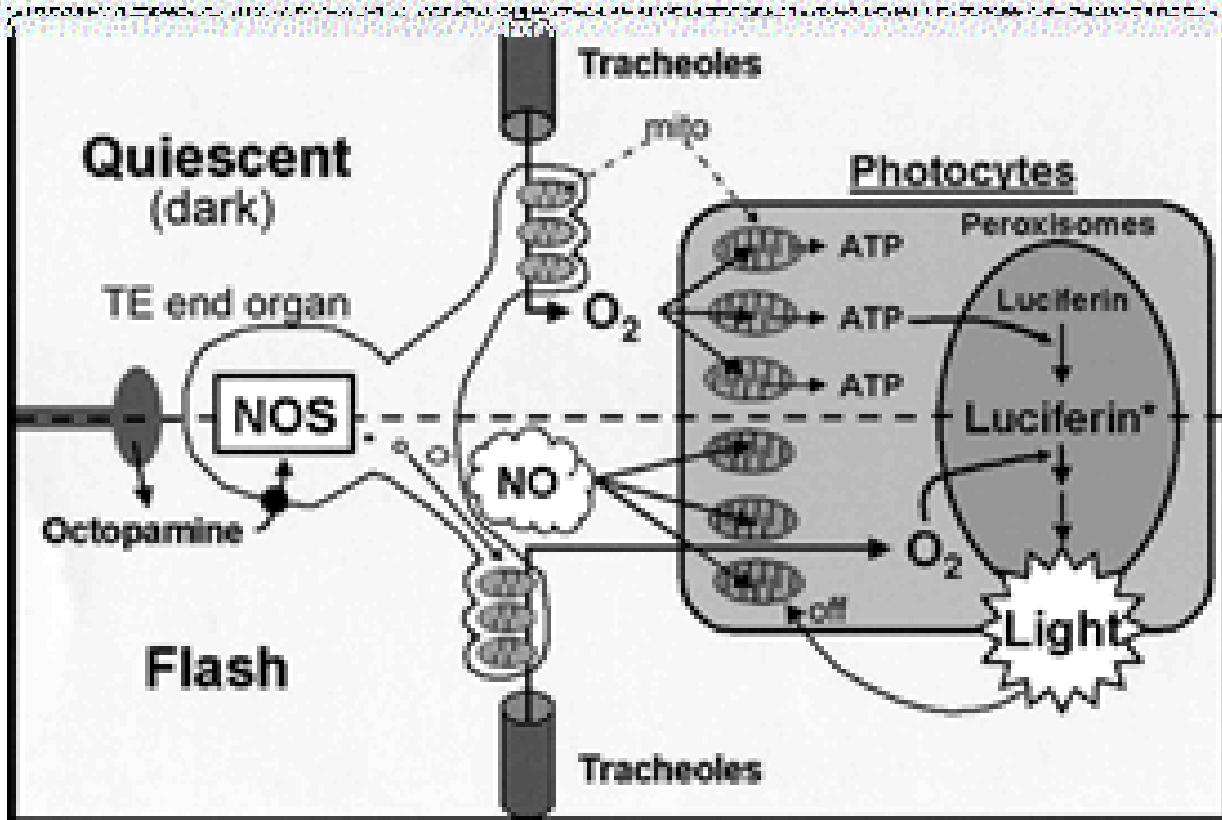
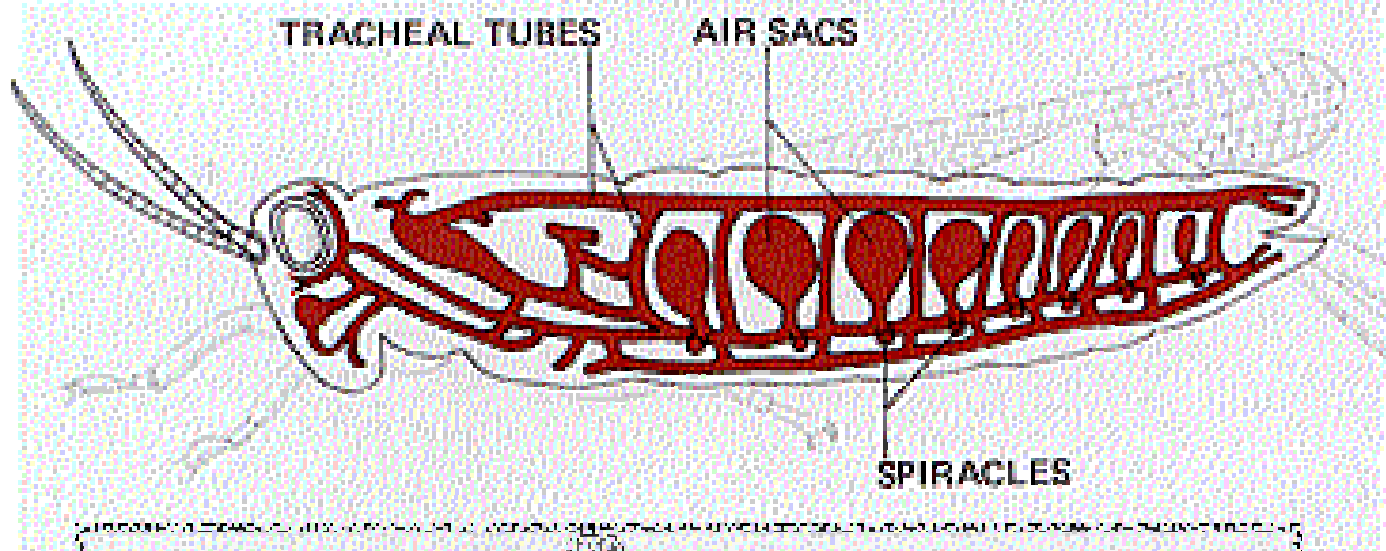
Další faktory zapojené do kontroly:

Dodávka vzduchu je regulována zavíráním průduchů – pouze v odpovědi na stres.

Může být také regulována difuze kyslíku skrz tracheoly zaplněné tekutinou.

Závěr:

NO a mitochondrie fungují jako nejdůležitější „gatekeepers“ pro kyslík.





Photinus pyralis eggs

Copyright 2003 by TAL





Large virgin female
Photinus pyralis "F"
is mounted by males
in an orgy trying
to copulate with her.

Photo (c) 2002 by Terry Lynch

Další příklad - **Phrixothrix** – Railroad worm

Arthropoda : Insecta : Coleoptera : Phengodidae Genus: **Phrixothrix**.



The railroad-worm *Phrixothrix histus* (actually a beetle larva) produces red light from its head, and green light along the rest of its body. © 1998 V. Viviani

U ryb je světlo produkováno BL bakteriemi.

Obr. - **Photoblepharon palpebratus**, s víčkem svého BL orgánu otevřeným (vlevo) a zavřeným (vpravo). Světlo je produkováno spojitě, ale jeho viditelnost do okolí je kontrolována rybou.

Funkce:

- * Lákání kořisti
- Signálování jiným jedincům
- Zmatení predátorůconfusing potential predators



Využití bakteriální luminiscence

Bioluminiscenční bakterie

Nyní známe 11 druhů 4 rodů

Vibrio, Photobacterium, Shewanella (Alteromonas) and Xenorhabdus (Photorhabdus)

Které produkují viditelnou BL

Jedná se především o bakterie v mořské vodě, některé jsou i terestrické (pouze rod Photorhabdus)

Mohou se objevovat samostatně volně existující, jako saprofyté, komenzálové, parazité živočichů a symbionti ve světelných orgánech

Vždy zahrnují i druhy (izoláty) bez luminiscence (Meighen & Dunlap 1993)

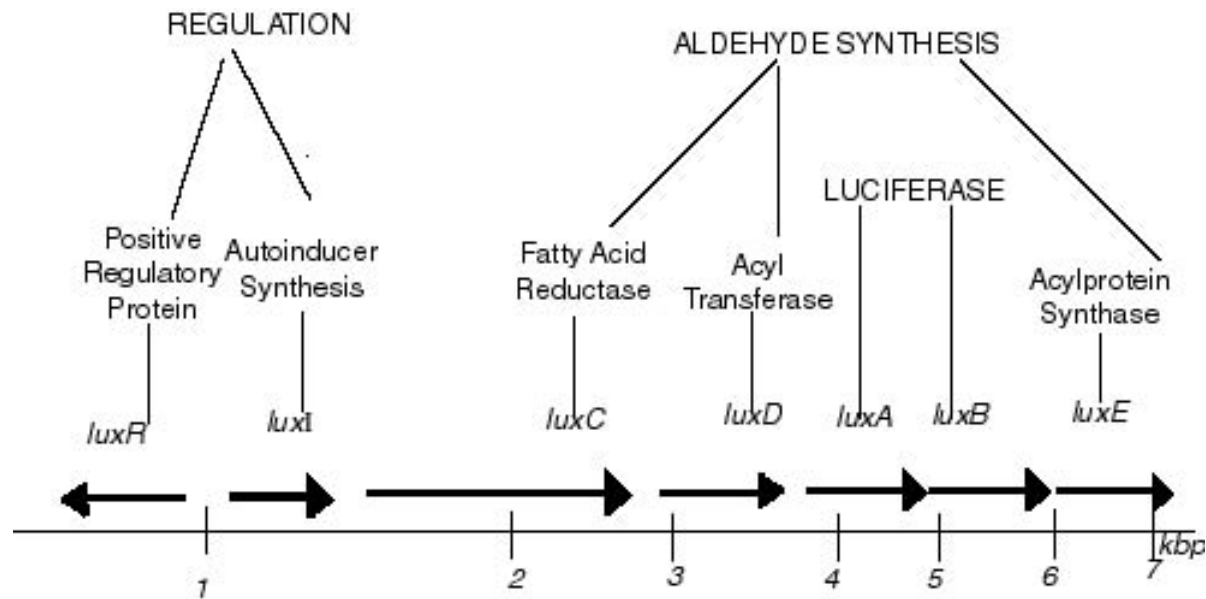
BL bakterie

- > Gram(-)
- > Emisní vlnová délka: 490 nm
- > Nesou *lux* operon který kontroluje emisi světla

Bioluminiscence bakterií je vyvolána reakcí molekulového kyslíku s redukováným flavin mononukleotidem (FMNH₂) a aldehydem za vzniku FMN, vody a mastných kyselin za účasti luciferázy. Luminiscence je energeticky náročná (vysoká spotřeba ATP luciferázou), vlnová délka emitovaného modrozeleného světla je 490 nm

Produkce luminiscence je těsně spjata s buněčným metabolismem a je tedy odrazem viability bakterií

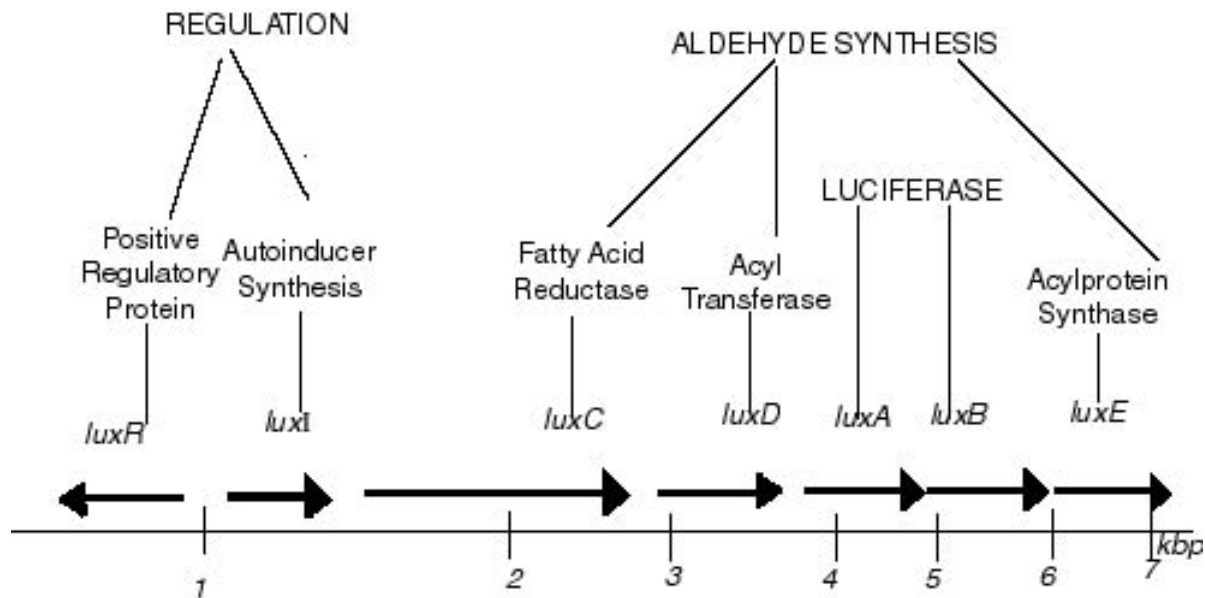
Vzestup intenzity světla během růstu BL bakterií odráží syntézu pěti proteinů kódovaných lux operonem



Bioluminiscenční (lux) geny jsou podobné pro všechny BL bakterie. Zahrnují 5 genů:

lux A a lux B jsou zodpovědné za **alfa a beta podjednotky luciferázy**

lux C, D a E kódují komplex reductázy mastných kyselin potřebné pro generování a recyklaci mastných kyselin na aldehyd (decanal).



Quorum sensing

Dva regulační geny: *I* a *R*

Gen I řídí syntézu *N*-acyl homoserin laktonu (HSL), signalizační molekuly známé jako autoinduktor potřebný pro aktivaci lux genů.

Gen R kóduje syntézu **N-acyl HSL receptoru** - transkripčního faktoru odpovídajícího na **N-acyl HSL** signál. Receptor má DNA binding doménu a N-acyl HSL binding doménu.

Hustota bakteriální suspenze je potřebná k dosažení kritické koncentrace autoinduktoru.

Poté dojde k vazbě luxR produktu a transkripci luminiscenčních genů.

Factory ovlivňující *in vivo* reakci

- > genetická kontrola
- > koncentrace rozpuštěného kyslíku
- > koncentrace Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů
- > intracelulární energetická rovnováha

Faktory ovlivňující bakteriální BL aktivitu

- > optimální pH kolem 7
- > změny v koncentraci NaCl
- > absorpce světla silným zabarvením vzorku
- > vysoká spotřeba kyslíku vzorkem

Důležité

Chemické, fyzikální a biologické toxikanty, které ovlivňují

- respiraci buněk
- syntézu proteinů
- syntézu lipidů
- integritu buněk
- a zvláště funkce buněčných membrán

mají silný vliv na *in vivo* BL

EC50 – Efektivní koncentrace (ppm - parts per million) toxikantů, které působí 50% inhibici luminiscence

Toxicant	EC50 @20-30 min	EC50 @50-60 min
Cadmium (II)	0.06	0.06
Copper	0.02	0.007
Lead (II)	0.1	0.2
Nickel (II)	0.1	0.01
Mercury (II)	0.07	0.03
Chlorpyrifos	1	0.3
Chlordane	0.2	0.15
DDT	0.12	0.06
Pentachlorophenol (PCP)	0.007	0.003
Aldrin	0.2	0.1
2,4-D	1	1.25
Aroclor 1254 (PCB)	0.01	0.008
Aroclor 1232 (PCB)	0.125	0.1
Fluoranthene (PAH)	0.3	0.15
Bromoform (THM)	0.3	0.3
Kerosene (TPH)	0.2	0.1
Diesel fuel (TPH)	0.7	0.25

Aplikace metody

- > odpadní vody
- > čerstvá voda (povrchová i spodní)
- > slaná a brakická voda
- > sedimenty a výluhy
- > další vzorky rozpustné ve vodě

Výhody analýz

- > snadno proveditelné
- > finančně nenáročné
- > vysoce citlivé
- > široké spektrum aplikací
- > eticky akceptovatelné
- > toxicitu je možno vztáhnout i na vyšší organismy
- > malý objem analyzovaného vzorku
- > krátká doba provedení = rychlé výsledky
- > statisticky spolehlivé (vysoký počet testovaných organismů)

Mezinárodní normy

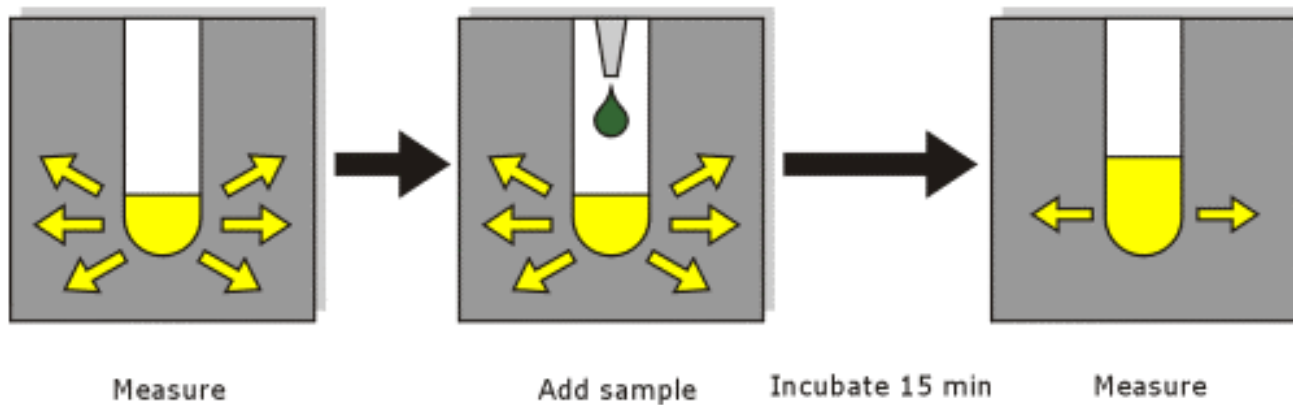
- Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*; Leuchtakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien, DIN 38 412-L34 (L341)
- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), ISO/CD 11348

Potřebné vybavení

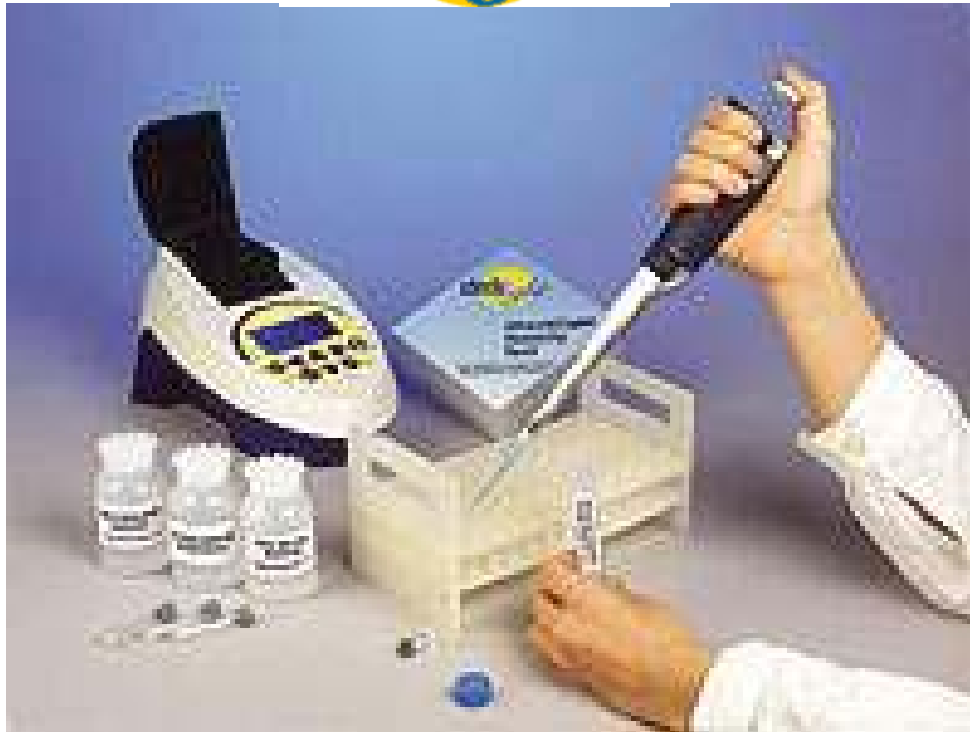
- (přenosný) luminometr
- kyvety nebo mikrotitrační destičky
- kultura bakterií
- NaCl
- čistá (redestilovaná) voda

Provedení testu

- Příprav (odeber) vzorek
- Nastav salinitu a pH (pokud je to nutné)
- Příprav si několik ředění vzorku
- Příprav kulturu bakterií, stabilizuj ji
- Pipetuj bakterie do zkumavek
- Změř BL aktivitu
- Přidej vzorek a inkubuj (podle bakt. kultury 15 nebo 30 minut nebo i déle)
- Změř BL aktivitu po inkubaci
- Vypočítej výsledky (EC_{50})

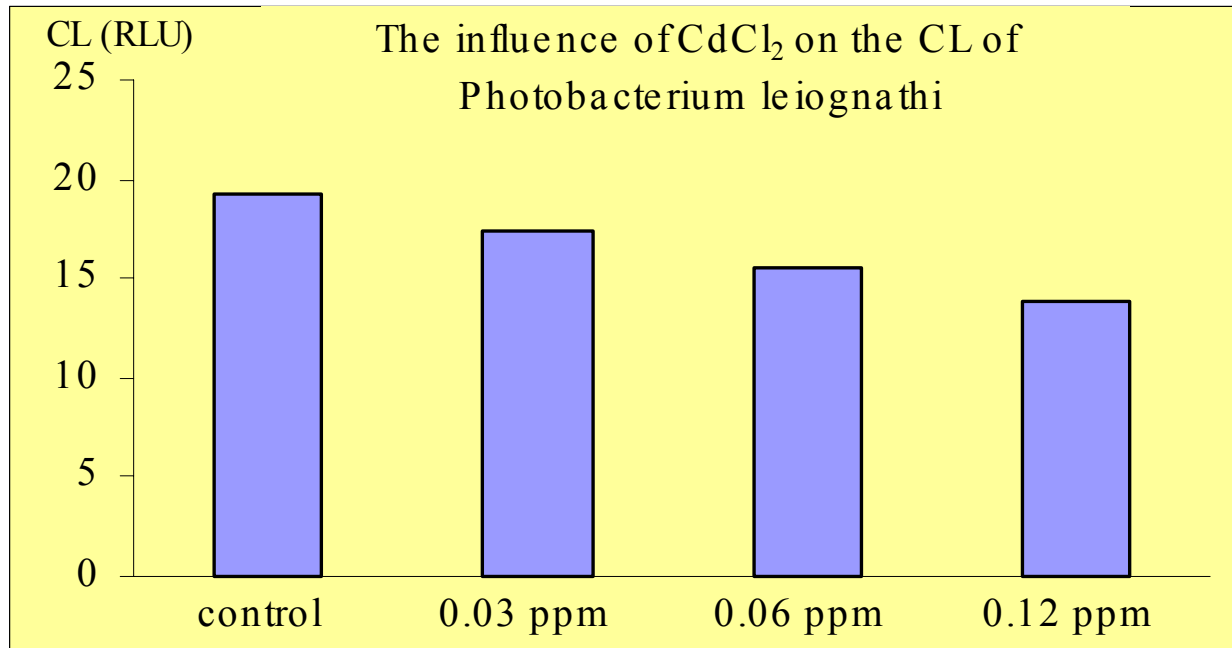


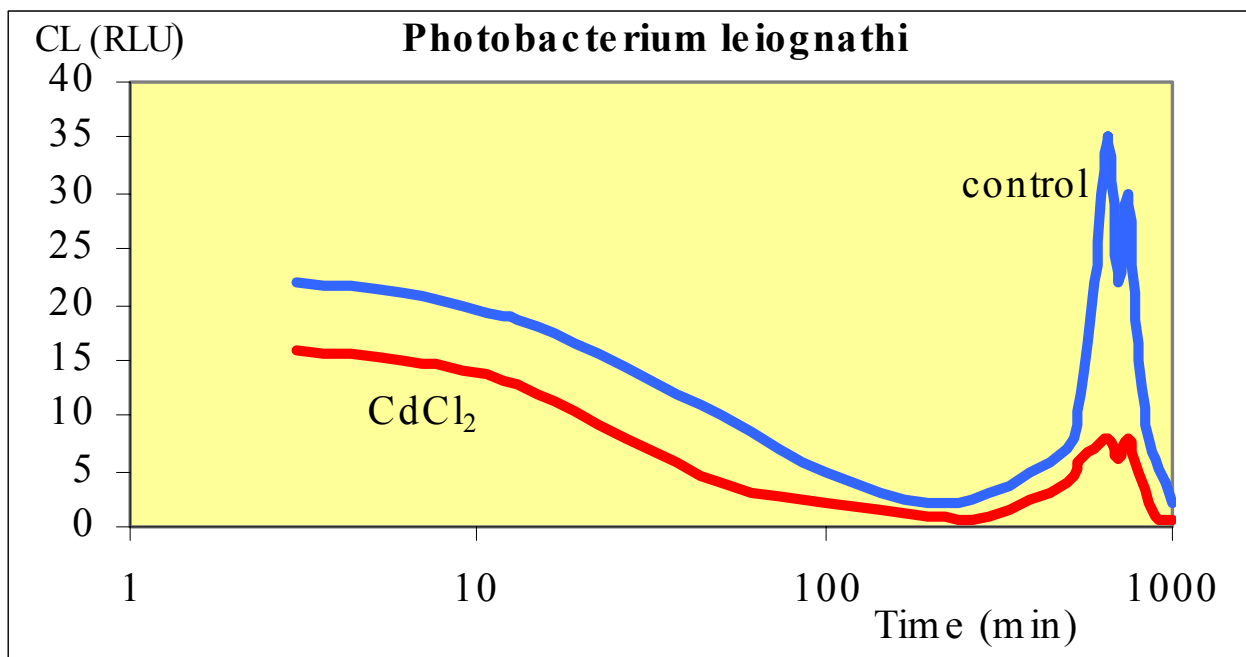
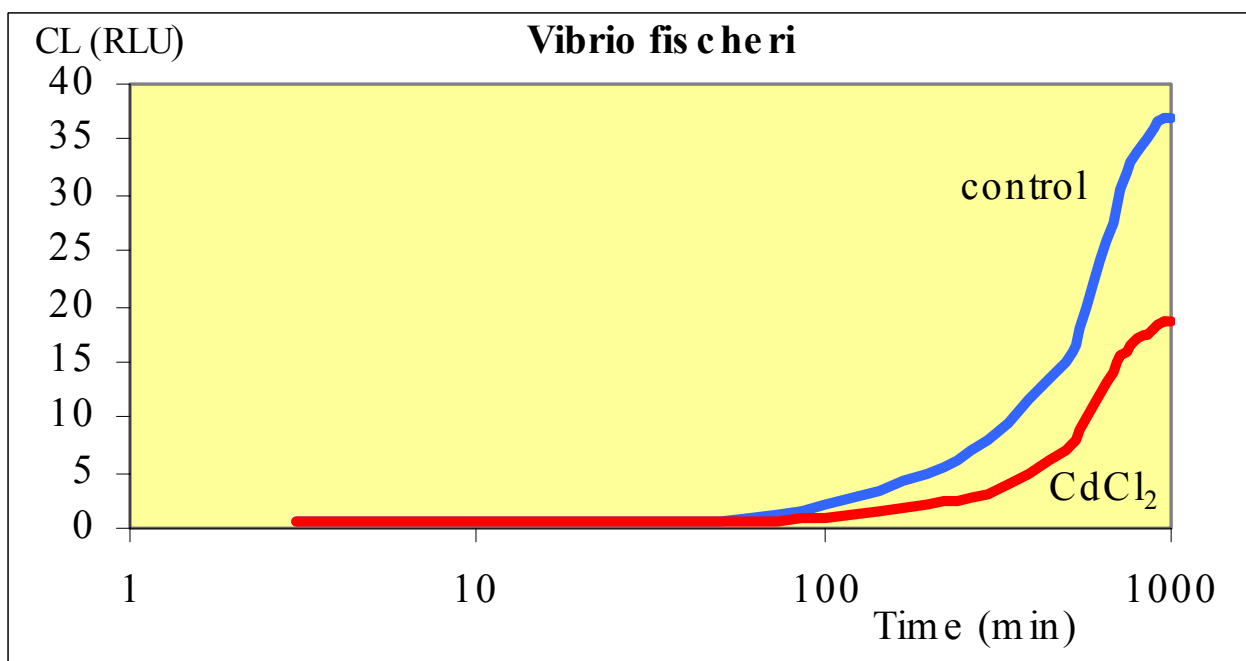
checklight



check*light*







Photorhabdus (=Xenorhabdus) luminescens:

- G⁻ tyčkovitá, bioluminiscenční, pohyblivá bakterie, velmi variabilní, velikosti v rozmezí od 2 x 0,5 do 10 x 2 μm s příležitostnými filamenti délky do 30 μm
- dřívější označení *Xenorhabdus luminescens* bylo změněno na základě fenotypové charakteristiky a příbuznosti DNA v roce 1993 vytvořením nového rodu *Photorhabdus*
- žije volně v půdě nebo v symbióze s EPN
- luminiscence *P. luminescens* je při 37°C 1000 x menší než u *Vibrio harveyi* při 25°C
- lux operon je luxCDABE, tj. minimální jaký funguje

Systematika rodu *Photorhabdus*:

určeno na základě příbuznosti DNA hybridizací DNA
(Fischer-Le Saux et al.1999)

P. luminescens - 5 poddruhů: ssp. - *luminescens*
- *akhurstii*
- *laumondii*
- *kayaii*
- *thracensis*

P. temperata - jeden poddruh: ssp.- *temperata*

P. asymbiotica - jeden poddruh: ssp. - *australis*

Typové kultury rodu *Photorhabdus* z CCM Brno:

***Photorhabdus asymbiotica* CCM 7074^T**

- izolace z lidského poranění, Texas

***Photorhabdus luminescens* ssp. *akhurstii* CCM 7075^T**

- izolace z *Heterorhabditis indica*, Guadeloupe

***Photorhabdus luminescens* ssp. *laumondii* CCM 7076^T**

- izolace z *Heterorhabditis bacteriophora*, Trinidad a Tobago

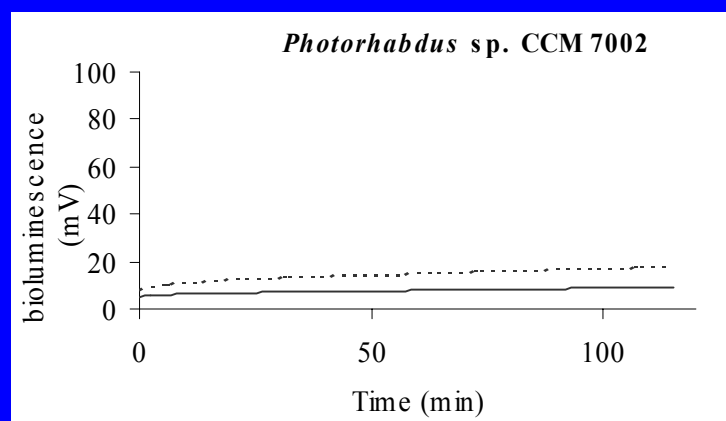
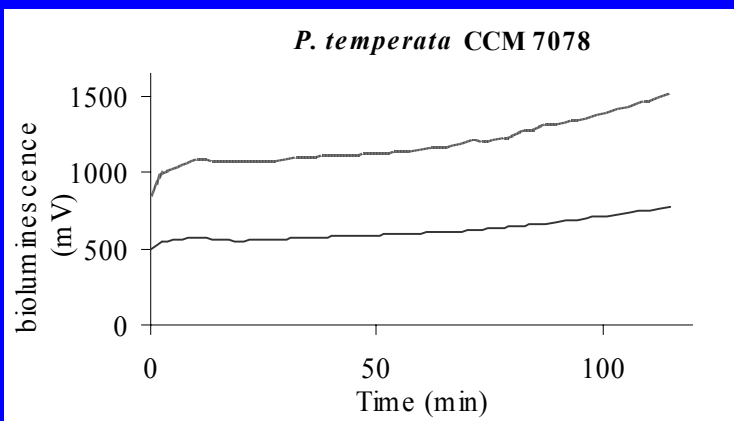
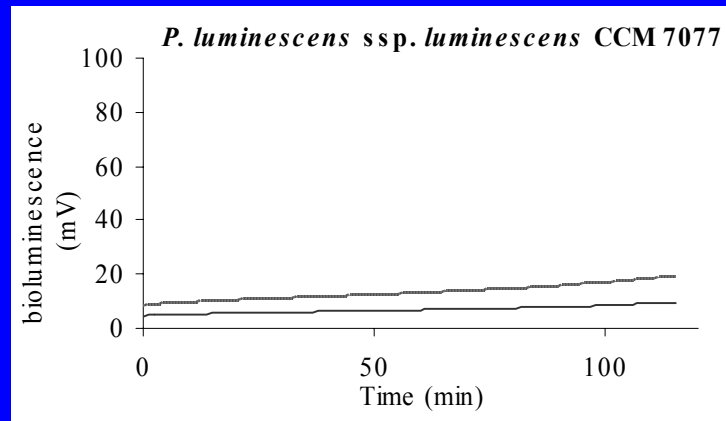
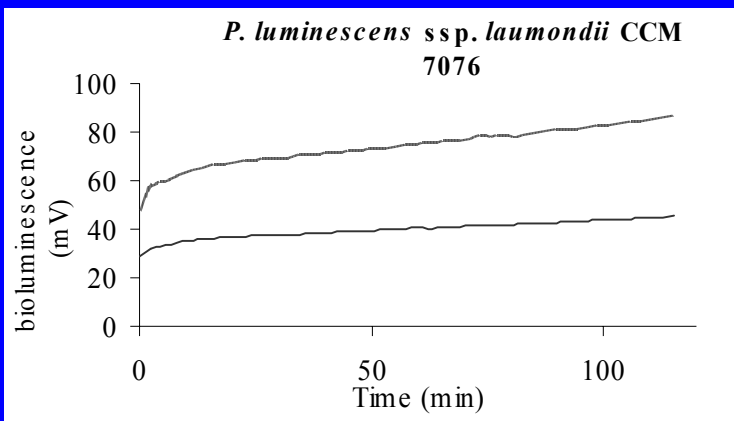
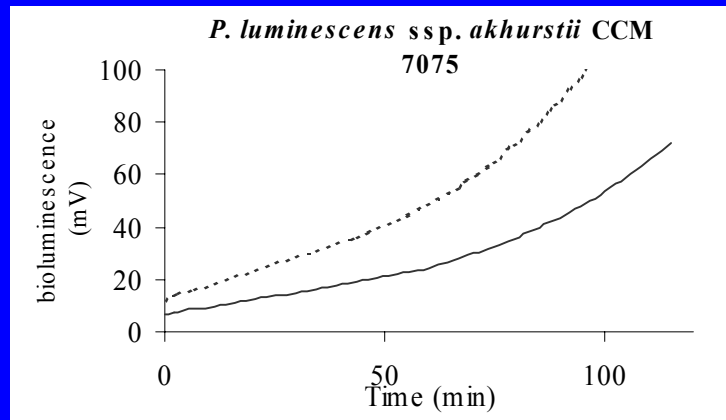
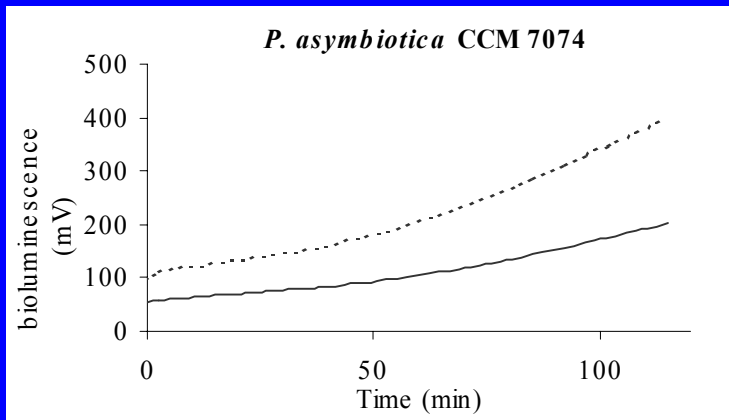
***Photorhabdus luminescens* ssp. *luminescens* CCM 7077^T**

- izolace z *Heterorhabditis bacteriophora*, Australia

***Photorhabdus temperata* CCM 7078^T**

- izolace z *Heterorhabditis megilis*, Rusko

25°C



37°C

